DEVELOPMENT OF ALGINATE BASED ANTIMICROBIAL HEMOSTATIC DRESSINGS

ANKITA SHARMA

DEPARTMENT OF TEXTILE AND FIBRE ENGINEERING

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

APRIL 2024

DEVELOPMENT OF ALGINATE BASED ANTIMICROBIAL HEMOSTATIC DRESSINGS

by

ANKITA SHARMA

Department of Textile and Fibre Engineering

Submitted

in fulfilment of the requirements of the degree of

Doctor of Philosophy

to the

INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

April 2024

DEDICATED TO MY PARENTS

CERTIFICATE

This is to certify that the thesis entitled '**Development of Alginate based Antimicrobial Hemostatic Dressings**' submitted by **Ms. Ankita Sharma** to the **Indian Institute of Technology Delhi** for the award of degree **Doctor of Philosophy**, is a record of bonafide research work carried out by her. She has worked under our guidance and supervision and fulfilled the requirements for the submission of this thesis which has attained the standard required for a Ph.D. degree of this institute. The results contained in this thesis are original and have not been submitted, in part or in full, to any other university or institute for the award of any degree or diploma.

Prof. Bhuvanesh Gupta

Department of Textile and Fibre Engineering

Indian Institute of Technology Delhi

New Delhi, India

Prof. Samrat Mukhopadhyay

Department of Textile and Fibre Engineering

Indian Institute of Technology Delhi

New Delhi, India

Dr. Amlan Gupta

Department of Pathology

Sikkim Manipal Institute of Medical Sciences

Gangtok, Sikkim, India

ACKNOWLEDGEMENTS

I am immensely grateful to God for the opportunities and blessings bestowed upon me and providing me the strength and perseverance throughout this research journey. I would like to express my sincere gratitude and appreciation to the following individuals who have been instrumental in the completion of my thesis. Without their support it would have been impossible for me to accomplish this thesis. That is why I would like to dedicate this section to recognize their support.

First and foremost, I would like to extend my heartfelt thanks and indebtedness to my venerated supervisors, **Prof. Bhuvanesh Gupta** (Department of Textile and Fiber Engineering, IIT Delhi, New Delhi, India), **Prof. Samrat Mukhopadhyay** (Department of Textile and Fiber Engineering, IIT Delhi, New Delhi, India), and **Dr. Amlan Gupta** (Department of Pathology, Sikkim Manipal Institute of Medical Sciences, Gangtok, Sikkim, India), for their invaluable guidance, unwavering support, and insightful feedback. Their expertise, patience, vast store of knowledge, and encouragement have been indispensable in shaping this research project and enhancing my academic growth. Their dedication to my success has been inspiring and I am really honoured to have such remarkable supervisors. They have always been a patient bearer of my mistakes. Words cannot describe the kindness and support I received from them. I am truly fortunate to have had the privilege of working under their mentorships.

I extend my sincere thanks to SRC members: Prof. Harpal Singh, Prof. Manjeet Jassal, and Prof. Rajiv Srivastava for their invaluable suggestions, critical reviews, and untiring help in designing the experimental strategies.

I would like to acknowledge IIT Delhi for providing me financial assistance throughout my Ph.D. tenure and "Research Scholar Travel Award (RSTA)" for attending the international conference. I also want to express my gratitude to Industrial Research & Development Unit,

IIT Delhi, for providing me the “Research Excellence Travel Award (RETA)” travel grant for attending international conference.

I would like to express my sincere regards to the Head of the Department (HOD), Prof. R. Alagirusamy and all the respected faculty members of the Department of Textile and Fibre Engineering for their cooperation of knowledge sharing during teaching assistantship and in smooth completion of my academic work. I would also like to acknowledge the facilities provided by the department and the supportive cooperation received from the departmental staff Mr. Amarjeet, Mr. V. K. Kala, Mr. R. Khattar, Mr. Shiv Upadhyay, Mr. Rohit Kumar, Mr. Sandeep Kumar, Dr. Virendra Sharma, and Dr. Vikas Khatkar.

I am also thankful to all CRF staff members especially to Mr. Kuldeep Sharma, Mr. Shiv Solanki, Mr. Dinesh Kumar, Mr. Mahesh Soni, Ms. Aastha Sharma, and Ms. Kumud Arora for their support during the instrumentation and characterizations of samples.

I have been very fortunate to be a part of great research team. I extend my deep gratitude to my lab colleagues (Dr. Chetna Verma, Ms. Pratibha Singh, Ms. Vandana Kumari, Ms. Manali Somani, Ms. Vipula Sethi, Ms. Rohini Verma) who have been a great support professionally and personally throughout this challenging endeavour and for maintaining the work friendly environment of the lab. Time to time celebrations for the research outcomes motivated me and allowed me to carry out this work with enthusiasm. The memories we created here are deeply rooted in my heart. I cannot express my gratitude in words for Dr. Chetna Verma for all the support and guidance during the ups and downs of this work and through the journey. Her continuous support and encouragement was like the strong pillar all the time. I would like to add special words of thanks to Ms. Pratibha Singh for sharing all the laughter and tears together and for making my life here a memorable one as we had a wonderful time together. She was always there to provide me a shoulder to lean on during times of thick and thin. Her support during the experimentations was appreciable.

I would like to express my gratitude to Ms. Prashansa Dalal for helping me in the career guidance. I deeply acknowledge the support received from Dr. Sonia Mann (CSIR- Institute of Genomics and Integrative Biology, Delhi, India) during the selection of herbal plants and their extract preparation. She has always been there to provide me unspoken support in my journey. I am also thankful to Dr. Rohit Sarda (Sikkim Manipal Institute of Medical Sciences, Gangtok, Sikkim, India) for helping in conducting the animal studies at SMIMS, Gangtok, Sikkim, India. I would like to thank Mr. Anees, Mr. Sumit Kapoor, and Ms. Parna Nandi for their endless help at every juncture of need. I would like to extend my heartfelt thanks to Dr. Shachi Mathur for helping me in the stress management during this journey.

I am also indebted to my loving parents, Mr. S. K. Sharma and Mrs. Nirmal Sharma for making me capable of reaching this height of education. My sister, Ms. Manu Sharma, Brother-in-law, Mr. Ankur Sharma, and two bundle of joy Aaryash and Aaryana for their unconditional love, belief in my abilities, and continuous encouragement. I am deeply grateful to my family for their patience, understanding, and motivation that have carried me through the ups and downs of this thesis journey.

Additionally, a stock of loving appreciation is reserved for my friends (Simran, Monika, Priyal, Gunjan, Dr. Rupsi Kharb, Varsha, Rangoli, Kshama) for solace during times of stress and have made this journey more enjoyable.

To everyone mentioned above and to whom I have missed to mention their names but have been a part of this thesis journey in any way, I extend my heartfelt gratitude. Your support, encouragement, and belief in me have been invaluable, I am truly grateful for the profound impact you have had on my academic and personal growth.

Thank you.

Ankita Shrama

ABSTRACT

Uncontrolled bleeding is acknowledged as primary cause of civilian and war field deaths before hospitalization and is also known for the debilitation of wound healing process. Irrepressible bleeding is also an inevitable reason for microbial infection. These challenges necessitate the development of materials with multifunctional properties of immediate blood clotting. Thus, present study was undertaken to develop herbal incorporated alginate based antimicrobial hemostatic cotton dressings for immediate blood clotting and antimicrobial activity.

In order to impart the infection resistant activity to hemostatic dressings, the synthesis of nano silver encapsulated carboxymethyl cellulose gels (CMC-Ag nanogels) was carried out. Silver nitrate was reduced and stabilized by the fructose and CMC, respectively. Preparation of nanogels is influenced by the reaction conditions, such as stabilizing agent concentration, reduction time, and reduction temperature. The phenomenon of agglomeration was observed for the higher concentrations of CMC due to high viscosity of reaction mixture, whereas, the low concentration was found to be insufficient for stabilizing the nanogels. In addition to this, the short reduction time showed incomplete reduction of ionic silver while, particle aggregation was observed when reduction was allowed for longer duration. However, the effect of reduction temperature leads to the formation of spherical nanogels which aggregated upon increasing the reduction temperature. The morphological analysis of CMC-Ag nanogels was investigated through HR-TEM analysis which indicated the core shell structure formation in the size range of 5-10 nm. Encapsulation of nano silver inside CMC matrix provided the functional groups to CMC-Ag nanogels for adhering on the cotton fabric. Optimized CMC-Ag nanogels were immobilized on the cotton fabric by varying the concentration of silver nitrate. These fabrics were investigated for their antimicrobial activity against *E. coli* (Gram-negative) and *S. aureus* (Gram-positive) bacterial strains by zone of inhibition, anti-adhesion analysis, time kill assay,

and colony count method where >99% bacterial colony reduction for CMC-Ag300 fabric (which was further designated as NG during the fabrication of hemostatic dressings).

To introduce the hemostatic activity, sodium alginate (SA) based blends were prepared with different content of glycerol (Gly). Rheological studies were conducted to investigate the flow behavior of blend system which revealed decrease in the viscosity upon increasing the Gly concentration. Contact angle analysis showed an increase in the hydrophilicity with the increase in the Gly content. Flexibility of films increased while the tensile strength decreased with the increase in the Gly content. These observations were attributed to the presence of Gly which enhanced polymer chain mobility by disturbing the intermolecular hydrogen bonding in SA. SA:Gly blends were coated on the cotton fabric where Gly content offered good flexibility to the fabric, similar to the pristine cotton gauze. The optimized blend of SA:Gly was designated as the SG for hemostatic dressing preparation.

To fabricate the antimicrobial hemostatic dressings, varying concentrations of three herbal extracts (Tannic Acid (TA), *Choerospondias axillaris* (CA), and *Mesua ferrea* (MF)) were added to the SG blend followed by their coating on the NG fabric by dip coat method. DPPH analysis showed an excellent antioxidant activity of developed dressings in a dose dependent manner. Presence of herbal extracts helped in clotting the blood faster than the control sample as measured by *in-vitro* blood clotting time analysis. FESEM analysis revealed the presence of stable clot with fibrin mesh on optimized dressings. The infection resistant behavior of the dressings was studied by the zone of inhibition, anti-adhesion analysis, and colony count method which exhibited more than 97% of viable colony reduction against *S. aureus* and *E. coli*. Additionally, dead bacterial cells were detected on the surface of dressing due the excellent antiadhesion activity. Biocompatibility of the dressings was delineated with MTT

assay on NIH3T3 cells which implicated more than 85% of cell viability suggesting their cytocompatible nature.

A comparative study of hemostatic activity of all optimized dressings with TA, CA, and MF (NGSG-MF3, NGSG-TA3, and NGSG-CA3) was carried out by *in-vivo* tail amputation test. Swiss albino mice were used for the analysis which indicated faster blood clotting in NGSG-MF3, NGSG-TA3, and NGSG-CA3 groups as compared to the other groups. Blood clotting efficiency was measured by the hemostatic time (s) and blood loss (g) which revealed that NGSG-CA3 dressing has the fastest clotting time of 66.37± 17.32 s and minimum blood loss of 0.135± 0.03 g. This investigation led to the development of a hemostatic dressing by combining SA, gly and CA as the hemostatic compound.

सार

अनियंत्रित रक्त स्राव को युद्धः क्षेत्र में होने वाली मौतों का प्राथमिक कारण माना जाता है। यह माइक्रोबियल संक्रमण को आमंत्रित करता है जिसकी वजह से घाव भरने की प्रक्रिया की गति धीमी हो जाती है। इन चुनौतियों को ध्यान में रखते हुए ऐसी ड्रेस्सिंग्स बनानी की आवश्यकता है जिनके पास तत्काल रक्त के थक्के ज़माने, शारीरिक कोशिकाओं के अनुकूल, और संक्रमण से निपटने की क्षमता हो। हेमोस्टॅटिक ड्रेस्सिंग्स बनाने के लिए कॉटन गोज़ेस को अनुकूल माना जाता है क्योकि इसके पास द्रव्य को सोखने की अच्छी क्षमता होती है जिससे यह रक्त के कंपोनेंट्स को एकत्र करने तथा घाव को बाहरी चोटों से बचाने की शक्ति रखता है। इस प्रकार, इस काम में हमने हर्बल एक्सट्रेक्ट युक्त अल्जिनेट की रोगाणुरोधी रक्त प्रवाह को रोकने वाली ड्रेस्सिंग्स बनायीं है।

अपने द्वारा बनायीं जाने वाली हेमोस्टॅटिक ड्रेस्सिंग्स को रोगाणुरोधी क्षमता देने के लिए हमने कार्बोक्सीमिथइल सेलुलोस की परत चढ़े नैनो सिल्वर जेल बनाये। इन नैनो जेल्स को बनाने के लिए सिल्वर नाइट्रेट को फ्रुक्टोज़ और सीएमसी की उपस्थिति में नैनो साइज में बदला गया जिसमे फ्रुक्टोज़ ने नैनो साइज में बदला तथा सीएमसी ने इन्हे स्थिर करने का काम किया। नैनो जेल बनाने की प्रक्रिया में रिएक्शन की स्थिति (जैसे सीएमसी की कॉन्सन्ट्रेशन, रिएक्शन का समय, रिएक्शन की तापमान) की बहुत बड़ी भूमिका होती है। स्थिर नैनोजेल बनाने के लिए स्थिरीकरण एजेंट की एक इष्टतम सांद्रता की आवश्यकता होती है। सीएमसी की निचली और उच्च सांद्रता के लिए संचयन की घटना देखी गई, जहां कम सांद्रता नैनोजेल को स्थिर करने के लिए अपर्याप्त पाई गई और उच्च सांद्रता ने प्रतिक्रिया मिश्रण की चिपचिपाहट को बढ़ा दिया। इसके अलावा, रिएक्शन समय विश्लेषण से संकेत मिलता है कि शुरुआती समय में आयनिक सिल्वर की अधूरा रिडक्शन देखा गया, जबकि लंबी अवधि के लिए रिडक्शन की अनुमति देने पर जेल का एकत्रीकरण देखा गया। हालाँकि, रिएक्शन की तापमान के विश्लेषण से पता चला कि तापमान में कमी के प्रभाव से गोलाकार आकार के नैनोजेल का निर्माण हुआ जो तापमान बढ़ने पर बड़े आकार में एकत्र हो गए। सीएमसी-एजी नैनोजेल के रूपात्मक विश्लेषण की जांच एचआर-टीईएम विश्लेषण के माध्यम से की गई, जिसने 5-10 एनएम की आकार सीमा में कोर शेल संरचना के गठन का संकेत दिया। कार्बोक्सीमिथइल सेलुलोस की परत नैनो सिल्वर को कॉटन गौज पे चिपकने के लिए कार्यात्मक समूह प्रदान करती है। इसके अलावा, सिल्वर नाइट्रेट की भिन्न-भिन्न सांद्रता को अनुकूलित सीएमसी-एजी नैनोजेल में डालकर कॉटन गौज़ पे चिपकाया गया। इन गौज़ की जांच ई. कोली (ग्राम-नेगेटिव) और एस. ऑरियस (ग्राम-पॉजिटिव) बैक्टीरियल संक्रमण के खिलाफ उनकी रोगाणुरोधी गतिविधि के लिए ज़ोन ऑफ़ इन्हिबीशन, एंटी ऐडहेशेन, टाइम किल, तथा कॉलोनी काउंट विधि की मदद से की गई थी। CMC-Ag300 फैब्रिक के लिए >99% बैक्टीरियल कॉलोनी में कमी का पता चला (जिसे हेमोस्टैटिक ड्रेसिंग के निर्माण के दौरान एनजी के रूप में नामित किया गया था)।

अपनी ड्रेस्सिंग्स में हेमोस्टॅटिक गुण और लचीलापन लाने के लिए हमने सोडियम अल्जिनेट और ग्लिसरॉल के मिश्रण का अध्यन करके अनुकूल सांद्रता का पता लगाया। मिश्रण प्रणालियों के प्रवाह व्यवहार की जांच करने के लिए रियोलॉजिकल अध्ययन आयोजित किया गया, जिसमें ग्लिसरॉल की सांद्रता बढ़ने पर चिपचिपाहट में

कमी का पता चला। संपर्क कोण विश्लेषण से ग्लिसरॉल की मात्रा में वृद्धि के साथ हाइड्रोफिलिसिटी में वृद्धि देखी गई। इसके अलावा, फिल्मों का लचीलापन बढ़ गया जबकि ग्लिसरॉल में वृद्धि के साथ फिल्मों की तन्यता ताकत कम हो गई। इन अवलोकनों को ग्लिसरॉल की उपस्थिति के लिए जिम्मेदार ठहराया गया था जो एसए के अंतर-आणविक हाइड्रोजन बांड को कमजोर करके बहुलक श्रृंखला की गतिशीलता को बढ़ाता था। एसए:ग्लिसरॉल के मिश्रणों को ऐड-ऑन प्रतिशत विश्लेषण के लिए कॉटन गौज़ पर लेपित किया गया, जिससे पता चला कि मिश्रणों में ग्लिसरॉल की सांद्रता बढ़ने पर (चिपचिपाहट कम होने के कारण) इसमें कमी आई। हमारे अध्यन से पता चला कि ग्लिसरॉल की ३०% सांद्रता मूलरूप कॉटन गौज़ के समान लचीलेपन को बनाए रख रही थी और इसमें 4.03±0.28% का ऐड-ऑन प्रतिशत था, इस मिश्रण को आगे के विश्लेषण के लिए अनुकूलित किया गया था। एसए:ग्लिसरॉल के इस अनुकूलित मिश्रण को हेमोस्टैटिक ड्रेसिंग विकास के लिए एसजी के रूप में नामित किया गया।

रोगाणुरोधी हेमोस्टैटिक ड्रेसिंग बनाने के लिए, तीन हर्बल अर्क (टीए, सीए और एमएफ) की अलग-अलग सांद्रता को एसजी मिश्रण में डाला गया और उसके बाद डिप कोट विधि द्वारा एनजी गौज़ पर उनकी कोटिंग की गई। विकसित ड्रेसिंग की डीपीपीएच विश्लेषण ने सांद्रता के अनुसार एंटीऑक्सीडेंट गतिविधि दिखाई। हर्बल अर्क वाली हेमोस्टैटिक ड्रेसिंग ने इन-विट्रो रक्त के थक्के जमने के समय विश्लेषण में कंट्रोल की तुलना में तेजी से रक्त का थक्का जमाने में मदद की, जबकि सबसे कम बीसीआई% के कारण, एनजीएसजी-एमएफ 3, एनजीएसजी-टीए 3 और एनजीएसजी-सीए 3 ड्रेसिंग को अनुकूलित किया गया था। एफईएसईएम विश्लेषण से अनुकूलित ड्रेसिंग पर फाइब्रिन जाल के साथ स्थिर थक्के की उपस्थिति का पता चला। इसके अलावा, अनुकूलित ड्रेसिंग की संक्रमण प्रतिरोधी गतिविधि को ज़ोन ऑफ़ इन्हिबीशन, एंटी ऐडहेशेन, तथा कॉलोनी काउंट विधि द्वारा जांचा गया, जिसमें एस. ऑरियस और ई. कोली बैक्टीरियल उपभेदों के खिलाफ 97% से अधिक मारने की क्षमता देखी गई। इसके अलावा, उत्कृष्ट एंटीएडिशन गतिविधि के कारण ड्रेसिंग सतह पर मृत जीवाणु कोशिकाएं देखी गईं। ड्रेसिंग की बायोकम्पैटिबिलिटी को एनआईएच3टी3 कोशिकाओं पर एमटीटी के साथ अध्यन किया गया था, जिसमें 85% से अधिक सेल प्रसार शामिल था, जो उनकी साइटोकंपैटिबल प्रकृति की ओर इशारा करता है।

इन-विवो टेल एम्प्यूटेशन टेस्ट द्वारा उनकी हेमोस्टैटिक गतिविधि के आधार पर सभी अनुकूलित ड्रेसिंग (एनजीएसजी-एमएफ 3, एनजीएसजी-टीए 3 और एनजीएसजी-सीए 3) का तुलनात्मक अध्ययन किया गया। विश्लेषण के लिए स्विस अल्बिनो चूहों का उपयोग किया गया, जिसमें अन्य समूहों की तुलना में एनजीएसजी-एमएफ3, एनजीएसजी-टीए3 और एनजीएसजी-सीए3 समूहों में तेजी से रक्त का थक्का जमने का संकेत मिले। रक्त के थक्के जमने की दक्षता को हेमोस्टैटिक समय (सेकंड) और रक्त छति (ग्राम) द्वारा मापा गया था, जिससे पता चला कि एनजीएसजी-सीए 3 ड्रेसिंग में सबसे तेज़ थक्का जमने का समय 66.37± 17.32 सेकेंड और न्यूनतम रक्त छति 0.135± 0.03 ग्राम है।

TABLE OF CONTENTS

LIST OF FIGURES

Chapter 1

Chapter 2

Chapter 3

Chapter 4

Chapter 5

LIST OF TABLES

LIST OF ABBREVIATIONS

Expanded Form	Abbreviation
Fourier transform-infrared spectroscopy	FTIR
X-ray diffraction	XRD
Scanning electron microscopy	SEM
Transmission electron microscopy	TEM
Field emission scanning electron microscopy	FESEM
Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy	EDX
Dynamic light scattering	DLS
High resolution transmission electron microscopy	HRTEM
Zone of inhibition	ZOI
Colony forming unit	CFU
Escherichia coli	E. coli
Staphylococcus aureus	S. aureus
Carboxymethyl cellulose	CMC
Silver nanoparticles	AgNP
CMC-Ag300 nanogel immobilized cotton fabric	NG
Sodium alginate	SA
Glycerol	Gly
SA:Gly (70:30) blend	SG
Blood clotting index	BCI
Red blood cells	RBC
Choerospondias axillaris	CA
Mesua ferrea	MF

Tannic acid	TA
Prothrombin time	PT
Tissue Factors	TF
Activated partial thromboplastin time	aPTT
Phosphate buffer saline	PBS
Polyvinyl alcohol	PVA
Polyethylene glycol	PEG
Polyvinylpyrrolidone	PVP
poly(-L-glutamic acid)	PGA
Propidium iodide	PI
Acridine orange	AO
Diphenyl picrylhydrazyl	DPPH
Dulbecco's modified Eagle's medium	DMEM
Fetal bovine serum	FBS
(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	MTT
Sodium-montmorillonite	MMT